

*На правах рукописи*

**Мартенс Эльвира Акрамовна**

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
*NEISSERIA MENINGITIDIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ  
ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМИ ФОРМАМИ ИНФЕКЦИИ И НОСИТЕЛЕЙ**

1.5.11 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,  
профессор

Сидоренко Сергей Владимирович

**Официальные оппоненты:**

**Чеботарь Игорь Викторович** - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной микробиологии, заведующий

**Жуховицкий Владимир Григорьевич** – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел бактериальных инфекций, ведущий научный сотрудник, лаборатория индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов, заведующий

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Особое место среди заболеваний нервной системы занимает менингококковая инфекция, возбудитель которой был описан еще на заре развития микробиологии (Покровский В.И. и др., 1976). Многие исследователи и врачи в разное время внесли существенный вклад в развитие представлений о менингококковой инфекции (Платонов А.Е. и др., 2019). *Neisseria meningitidis* - грамотрицательный микроорганизм, единственным хозяином которого является человек, колонизирует верхние дыхательные пути и в то же время способен вызывать угрожающие жизни эндемические и эпидемические инфекционные болезни, в частности, менингококцемию, сепсис и менингит. Гнойный бактериальный менингит может развиваться в любом возрасте, но наиболее часто поражает детей первых двух лет жизни (Королева И.С. и др., 2014). Впервые менингит, возможно менингококковой этиологии, был описан в 1661 году (Willis T., 1685). В Российской Федерации показатель заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции у детей первого года жизни в отдельных регионах достигает 12–18 случаев на 100 000 детей этого возраста, у детей до 14 лет – 2,16 на 100 000 (Лобзин Ю.В. и др., 2018). Несмотря на спорадический характер, генерализованная форма менингококковой инфекции непредсказуема по течению и характеризуется высоким риском летальных исходов (8–15%), которые при септическом шоке и тяжелом сепсисе достигают 40–80 % (Скрипченко Н.В. и др., 2017).

В настоящее время основными направлениями деятельности по сдерживанию менингококковой инфекции являются вакцинация и химиопрофилактика, направленные на предотвращение инфекции, и антибиотикотерапия развившихся инфекций. Современные менингококковые вакцины представлены полисахаридными, конъюгированными и содержащими субкапсульные антигены препаратами для профилактики инфекций, вызываемых *Neisseria meningitidis* серогрупп А, С, W, Y и B. Антибактериальная терапия и профилактика менингококковой инфекции основана на бета-лактамах, фторхинолонах, макролидах и амфениколах, ко всем этим препаратам формируется и распространяется устойчивость. Однако, существующие методы оценки антибиотикочувствительности в рутинной практике окончательно не стандартизованы, не ясны преимущества и недостатки отдельных методов.

Особого внимания требует выявляемая в последние годы тенденция к распространению на территории России вирулентной генетической линии sequence type (ST) 11 серогруппы W. По данным российских исследователей в Москве с 2011 года по 2016 год отмечалось увеличение доли *Neisseria meningitidis* серогруппы W в структуре возбудителей генерализованных форм менингококковой инфекции (Миронов К.О. и др., 2017). На сегодняшний день данные по клональной структуре популяции менингококков в Санкт-Петербурге отсутствуют.

На сегодняшний день на фоне углубленного изучения менингококков в мире, в Российской Федерации имеется лишь ограниченная информация об антигенной и клональной структуре популяций менингококков от носителей и больных генерализованными формами инфекции, ограниченная, как правило, тестированием штаммов *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Москве (Нагибина М.В. и др., 2018)., крайне ограничены сведения о чувствительности выделенных изолятов к препаратам, применяемым для профилактики и лечения менингококковых заболеваний (Королева М.А. и др., 2016).

В связи с тем, что фенотипическая и генетическая характеристика выделенных изолятов *Neisseria meningitidis* является одним из важнейших параметров эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией в Санкт-Петербурге, данное исследование является актуальным.

### **Степень разработанности темы исследования**

Молекулярная эпидемиология *N. meningitidis* – одно из наиболее бурно развивающихся направлений исследований нескольких последних десятилетий. Именно для *N. meningitidis* группой Martin C. Maiden был разработан метод мультилокусного сиквенс-типирования (multilocus sequence typing – MLST) (Maiden M.C. et al., 1998), в последующем ставший основой типирования всех бактерий.

Важность изучения *N. meningitidis* подчеркивается большим количеством публикаций, представленных на web-ресурсе PubMed, ежегодно по этой теме публикуется около 300 научных работ, в которых освещается широкий спектр вопросов, в том числе методы детекции и типирования *N. meningitidis*, фенотипические и генотипические характеристики штаммов от бессимптомных носителей и больных, влияние различных схем вакцинации на антигенное и генетическое разнообразие менингококков, распространение генетических

линий и клональных групп *N. meningitidis* в определенных временных промежутках, географических регионах, среди конкретных сообществ и групп людей, механизмы резистентности к различным группам антимикробных препаратов и динамика чувствительности *N. meningitidis* к антибиотикам, применяемым для лечения и профилактики менингококковой инфекции.

Благодаря доступности метода полногеномного секвенирования были достигнуты успехи в создании вакцин. Так, например, при разработке вакцин против *N. meningitidis*, серогруппы В была впервые реализована стратегия, известная как «обратная вакцинология» (Pizza, M. et al., 2000; Sette, A. et al., 2010). Стратегия включает биоинформатический анализ генома целевого патогена, выбор потенциальных антигенов-мишеней, оценку их вариабельности в микробной популяции, изучение протективных свойств на различных экспериментальных моделях, конструирование прототипа вакцин и, наконец, его оценку в клинических испытаниях.

### **Цель исследования**

Дать фенотипическую и молекулярно-генотипическую характеристику изолятов *N. meningitidis*, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге.

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнительную оценку классических культуральных и молекулярных методов детекции и серотипирования изолятов *N. meningitidis*, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции.

2. Провести сравнительную оценку методов оценки чувствительности *N. meningitidis* к антибактериальным препаратам, характеризовать распространенность и механизмы резистентности изолятов, выделенных от носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции.

3. Изучить структуру популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге среди носителей и больных генерализованными формами менингококковой инфекции, и ее взаимосвязь с глобальными генетическими линиями.

4. На основании данных о клональной структуре и антимикробной резистентности *N. meningitidis* обосновать направления оптимизации вакцинопрофилактики и этиотропной

терапии менингококковой инфекции.

### **Научная новизна**

Впервые охарактеризована структура популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Выявлена высокая гетерогенность менингококков по ядерному геному, 53 жизнеспособных изолята относились к 12-ти сиквенс-типам и 8-ми клональным комплексам. При этом три сиквенс-типа (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) и три клональных комплекса (cc174, cc198 и cc1136) ранее в России не встречались.

Впервые выявлено, что российские изоляты серогруппы W, относящиеся к ST-11 (W-ST11), образуют отдельную генетическую линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj. Эта линия, в свою очередь, была разделена на три сублинии: одна - изоляты из Москвы и две - изоляты из Санкт-Петербурга.

В серогрупповом составе менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, выявлено преобладание серогруппы B. Впервые проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных вакцин 4CMenB и rLP2086 и менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Установлено, что нетипируемые изоляты *N. meningitidis*, несущие locus *cnl*, распространены в основном среди здоровых носителей, но могут вызывать и генерализованные формы менингококковой инфекции у детей в возрасте от 0 до 17 лет.

Впервые установлено, что снижение чувствительности к пенициллину у менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, связано с формированием мутаций в гене *penA*. Выявлена корреляция между указанными мутациями и повышенными значениями МПК пенициллина, определяемыми методами серийных разведений в агаре и градиентной диффузии. Повышенные значения МПК пенициллина, определяемые методом серийных разведений в бульоне, не коррелировали с указанными мутациями.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученный комплекс генетических и фенотипических характеристик популяции менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, дополняет теоретические представления о распространении глобальных генетических линий и их эволюции на локальном уровне, а также позволяет обосновать стратегию профилактики и лечения менингококковых инфекций.

Обнаружение доминирования изолятов серогруппы B среди менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, обосновывает необходимость внедрения в практику

иммунопрофилактики менингококковых инфекций вакцин, обеспечивающих защиту от инфицирования бактериями этой серогруппы. В то же время, на основании полученных данных можно предположить, что современные субкапсулярные вакцины 4СMenВ и rLP2086 могут обеспечить протективный эффект в отношении соответственно 28,6% и 42,9% менингококков серогруппы В, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Очевидна необходимость разработки отечественной вакцины в большей степени соответствующий антигенному составу менингококков, циркулирующих в регионе.

Показано, что в настоящее время цефтриаксон может рассматриваться в качестве надежного средства эмпирической терапии менингококковых инфекций, поскольку устойчивости к этому антибиотику среди менингококков не выявлено. Однако снижение чувствительности к пенициллину, обусловленное мутациями в гене *penA* белка, может быть начальным этапом формирования устойчивости к цефалоспорином. Указанная негативная тенденция обосновывает необходимость внедрения стандартных и воспроизводимых методов оценки чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам.

Установлено, что методы оценки чувствительности менингококков в агаре (серийных разведений и градиентной диффузии) позволяют получить более достоверные результаты по сравнению с методом серийных разведений в бульоне. Методы оценки чувствительности в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения.

Показано, что внедрение молекулярных методов в алгоритм диагностики менингококковых инфекций и типирования возбудителя позволяет существенно сократить срок исследования и обеспечить идентификацию и типирование как жизнеспособных изолятов *N. meningitidis*, так и их ДНК непосредственно из биологического материала.

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ при проведении сертификационных циклов повышения квалификации для врачей по специальности «Бактериология» и дополнительные профессиональные программы повышения квалификации врачей «Бактериальные менингиты», «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам», а также в лекционный материал при обучении врачей-ординаторов (Акт внедрения от 28.09.2021).

Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики менингококковой инфекции внедрены в работу клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» (Акт внедрения от 23.09.2021г.), специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 22 (Акт внедрения от 24.09.2021).

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы основана на современных научно обоснованных принципах изучения клональной структуры популяции *N. meningitidis* и спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Для исследования изолятов *N. meningitidis* и их ДНК, выделенных от больных генерализованными формами и носителей, использовали комплексный подход, включающий изучение фенотипических и молекулярно-генотипических особенностей бактерий. В работе использовались классические культуральные (бактериологические), серологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы исследования.

Одобрение настоящей диссертационной работы было получено после проведения этической экспертизы Локальным Этическим Комитетом ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Выписка из протокола заседания №102 от 25 мая 2018 года).

**Биологические образцы.** Образцы крови, цереброспинальной жидкости и изоляты *N. meningitidis*, выделенные за период 2009–2020 г.г. от пациентов в возрасте от 0 до – 17 л с генерализованными формами менингококковой инфекции. Носоглоточные мазки и изоляты *N. meningitidis*, выделенные от здоровых лиц (абитуриенты, курсанты Военно-медицинской академии им С.М. Кирова, Санкт-Петербург) в возрасте 18-20 лет.

**Микробиологические методы.** Посев, культивирование и выделение *N. meningitidis* осуществляли при температуре 37 °С в течение 18-24 ч на сывороточном агаре. Идентификацию культур проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на приборе Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия), со средним коэффициентом идентификации (score) 2,193. Оценку антибиотикочувствительности *N. meningitidis* к бензилпенициллину, ампициллину, меропенему, хлорамфениколу, азитромицину, рифампицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону проводили тремя методами: методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мг/л в бульоне Mueller Hinton (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана в соответствии с



рекомендациями CLSI 2011- 2013; методом градиентной диффузии в агар (с использованием МІС-полосок); методом разведений в агаре Mueller Hinton (БиоРад, США) с добавлением 5% крови барана.

**Молекулярно-генетические методы.** Выделение ДНК из чистых культур *N. meningitidis* и биологических образцов проводили с помощью набора Магно-сорб (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) на автоматической станции пробоподготовки Xiril Neon 100 серии (Xiril AG, Швейцария), в соответствии с инструкциями производителя. Детекцию ДНК *N. meningitidis* в биологических образцах, типирование чистых культур бактерий и ДНК, выделенных из биологических образцов, проводили с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров, зондов на термоциклере CFX96 (БиоРад, США).

Для полногеномного секвенирования геномную ДНК культур выделяли с использованием наборов PureLink Genome kit (InvitroGen, USA) по протоколу производителя. Концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit с использованием наборов DNA High Sensitivity. Мультиплексирование и приготовление ДНК-библиотек проводили с помощью наборов Nextera Flex (Illumina) согласно протоколу производителя. Оценку длин фрагментов ДНК-библиотек осуществляли на приборе Agilent TapeStation 4150 (USA) с наборами High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, USA). Полногеномное секвенирование проводили на приборе Miseq (Illumina, USA), с использованием 300 п.н. парноконцевых прочтений на картридже V3 - 600 ( Illumina, USA ).

**Биоинформатические методы.** Полученные в ходе полногеномного секвенирования риды (прочтения) нуклеотидных последовательностей собирали в контиги de Novo. Полученные контиги аннотировали с помощью онлайн ресурса RAST. Полученные парные прочтения были обработаны TrimGalore 0.6.0 и после этого была проведена сборка геномов с помощью пайплайна (упорядоченной последовательности действий) Unicycler. Полученные сборки были проаннотированы PROKKA. Далее, проведен филогенетический анализ геномов НИИДИ - ДНКЦИБ с использованием kSNP3 и выделены группы наиболее схожих изолятов. Внутри этих групп был проведен поиск полиморфизмов с целью выявления факторов, ассоциированных с антибиотикорезистентностью. Поиск осуществлялся следующим образом: парные прочтения чувствительного изолята к антибиотику интереса выравнивали на геном-референс, демонстрирующий резистентность

к антибиотику интереса с помощью программ BWA (Burrows-Wheeler Aligner) и SAMtools, и BEDtools с целью визуальной и статистической оценки покрытия сборки. После этого проводился поиск полиморфизмов с помощью программы freebayes и их фильтрация по качеству с помощью программы SnpEff. Полученные данные валидировались вручную посредством визуализации полиморфизмов в IGV браузере. Помимо данных НИИДИ-ДНКЦИБ, в работе использовались полногеномные сборки *N. meningitidis* из публичной базы данных PubMLST.

**Статистическая обработка результатов исследования.** Все полученные в ходе исследования результаты были проанализированы с помощью следующего программного обеспечения: Microsoft «Excel» (Office 2019) составление базы данных. Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows и таких процедур как корреляционный анализ, анализ таблиц сопряженности, описательная статистика количественных и качественных признаков. При сравнении результатов антибиотикочувствительности, полученных при постановке разными методами, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, поскольку распределение изучаемых показателей не соответствовало нормальному закону.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Личное участие автора заключалось в сборе, анализе научной литературы, планировании и проведении экспериментальной части, в выполнении молекулярно-генетических исследований, а также бактериологических и серологических, пополнении коллекции изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных и носителей. Разделы работы по молекулярным исследованиям, включая полногеномное секвенирование, выполнены совместно со с. н. с. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.б.н. Гостевым В.В., врачом КЛД клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Калисниковой Е.Л. Посев, выделение чистой культуры, идентификация, определение серогрупп изолятов *N. meningitidis* выполнены совместно со с.н.с. НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.м.н. Железовой Л.И. Биоинформатическая обработка результатов, полученных в ходе полногеномного секвенирования, выполнена совместно с лаборантом-исследователем НИО медицинской

микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Лихолетовой Д.В. Статистическую обработку результатов осуществляли совместно со с. н. с. НИО по организации и управлению научно-исследовательскими работами ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, профессором, д. м. н. Григорьевым С.Г.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Для эффективной профилактики менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге необходимо применение как квадριвалентной (ACWY) полисахаридной конъюгированной менингококковой вакцины, так и вакцины против серогруппы В, однако антигенная структура современных субкапсулярных вакцин (4CMenB и rLP2086) требует модификации, поскольку она не соответствует антигенной структуре менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге.

2. *N. meningitidis*, циркулирующие в Санкт-Петербурге сохраняют чувствительность к большинству антибактериальных препаратов, что позволяет рекомендовать для лечения генерализованных инфекций цефалоспорины третьего поколения. В то же время выявление мутаций в генах пенициллинсвязывающих белков является первым признаком формирования устойчивости к этим антибиотикам.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов исследования обеспечивается проведением исследовательских работ с использованием современных методов лабораторной диагностики менингококковой инфекции в соответствии с международными рекомендациями. Результаты статистически обработаны с порогом принятия значимости ( $p$ )<0,05.

Диссертационная работа по теме «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», выполнена в рамках НИР 019-К1 по теме «Фенотипическая и молекулярно-генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей». По техническому заданию НИР 019-К1 выполнена медицинская технология «Молекулярные методы для детекции и типирования (определение серогруппы) *Neisseria meningitidis*, выделенных у пациентов с генерализованными формами менингококковой инфекции и у

носителей» и утверждена на Ученом совете от 29.09.2022 года (протокол №9).

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании Ученого Совета в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» 28 декабря 2021 года (Протокол №10).

Основные результаты настоящей диссертационной работы были представлены в виде докладов и тезисов: на Российской научно-практической конференции «Менингококковая инфекция: прежний опыт и новые угрозы. Другие бактериальные и вирусные поражения нервной системы» (Санкт-Петербург, 30–31 января 2018 г.); на Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2018» (Санкт-Петербург, 12–14 сентября 2018 г.); на Четвертой Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» (Москва 14–15 ноября 2018 г.); на Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г.); XXII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.); на Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2019» (Санкт-Петербург, 11–13 сентября 2019 г.); XXIII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.); XXIV Кашкинские чтения. Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.); на 31<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Online 9-21 July 2021); на VII Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2022 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 10 научных работ, из которых 3 – статьи в рецензируемых изданиях, 5 статей в других изданиях, 2 тезисов в материалах конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит введение,

обзор литературы, три главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 206 источников, 17 из которых – отечественные, 189 – зарубежные.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Детекция и серотипирование *N. meningitidis*

Биологические образцы пациентов с подозрением на генерализованные формы менингококковой инфекции (кровь и цереброспинальная жидкость) с 2013 по 2020 год (n=193) были изучены фенотипическими (бактериологическими) и молекулярно-генетическими (ПЦР) методами. Частота положительных результатов при детекции *N. meningitidis* методом ПЦР варьировала от 29% в 2013 г. до 64% в 2015 г., что существенно выше, чем при использовании бактериологического метода, при котором частота положительных находок находилась в интервале от 8% в 2015 г. до 32% в 2017 г. (Рисунок 1). Различия в частоте подтверждения диагноза в пользу метода ПЦР по сравнению с бактериологическим методом за весь период наблюдения были статистически достоверными (p<0,05).

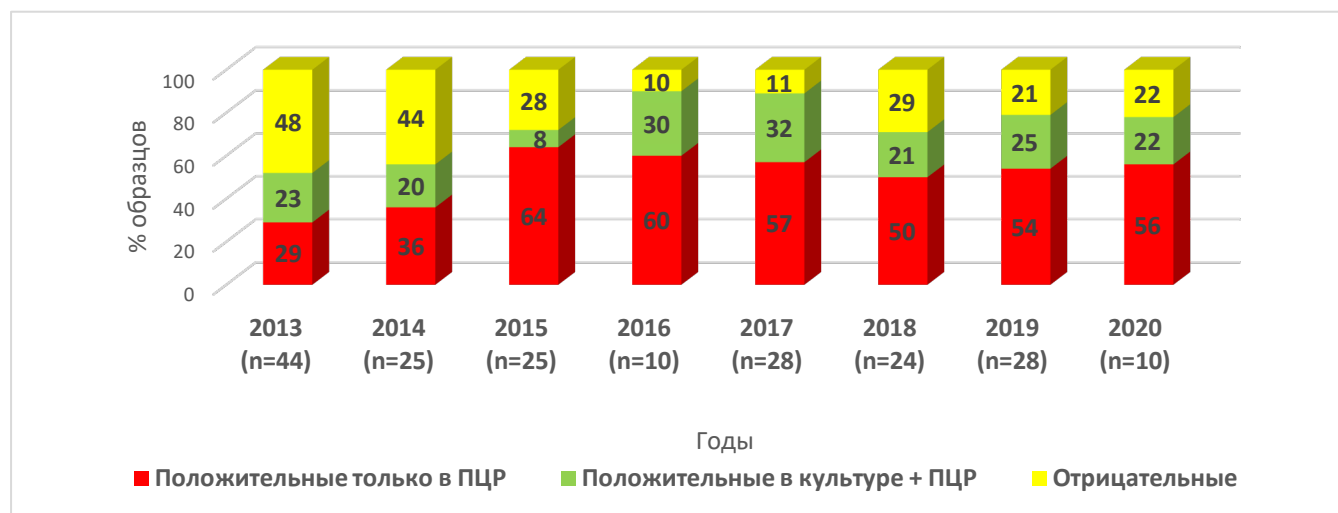


Рисунок 1 – Результаты детекции *N. meningitidis* бактериологическим методом и ПЦР в образцах крови и ЦСЖ, p<0,05

В результате исследования биологических образцов (кровь, ЦСЖ) пациентов с ГФМИ было установлено, что *N. meningitidis* детектировалась методом ПЦР чаще, чем фенотипическими методами.

В результате определения серогруппы *N. meningitidis* молекулярными методами (ПЦР в реальном времени) было установлено, что в Санкт-Петербурге среди изолятов, выделенных от больных, доминируют изоляты, относящиеся к серогруппе В - 45% (Рисунок 2). Эти результаты крайне важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции. Внедрение квадριвалентной менингококковой вакцины, содержащей полисахариды групп А, С, W и Y, обеспечит охват лишь только половины циркулирующих в регионе менингококков. Очевидна необходимость внедрения в практику вакцины против серогруппы В. Следует отметить неполное соответствие между результатами, получаемыми при типировании методом ПЦР и путем традиционного серотипирования. В значительной степени это связано с субъективным характером учета агглютинации. В пользу большей достоверности результатов, получаемых при типировании молекулярным методом, говорит обнаружение у «негруппируемых» изолятов в участке генома, ответственном за образование капсулы, вставки нулевого локуса (capsule null locus – *cnl*) длиной 113-114 п.н.

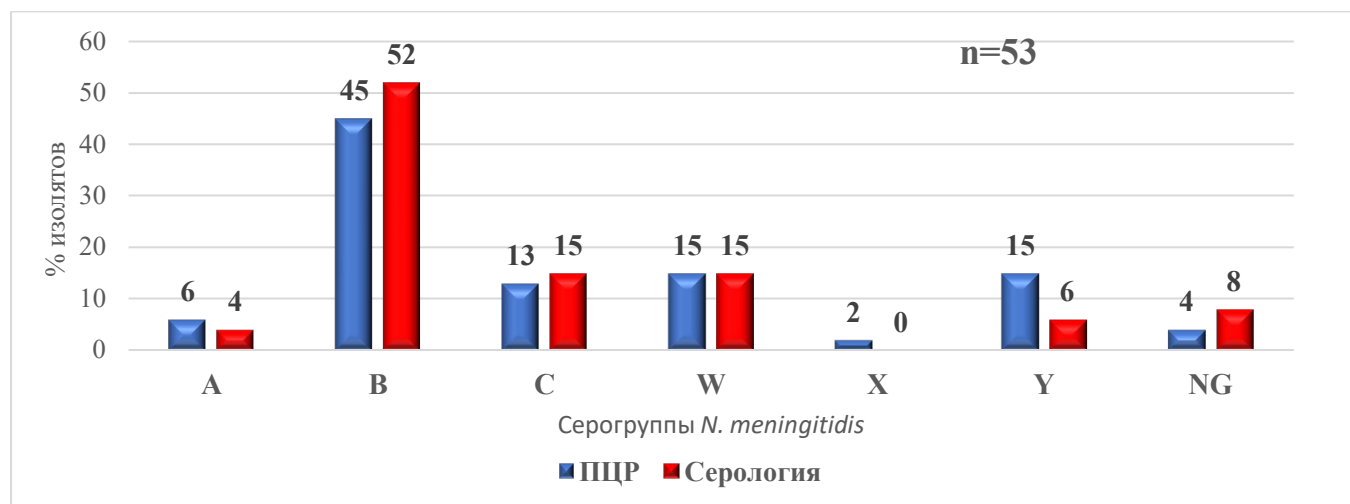


Рисунок 2 - Серогрупповой состав *N. meningitidis*, вызывающих генерализованные формы менингококковой инфекции в Санкт-Петербурге (% изолятов). Результаты получены при использовании различных методов типирования: традиционного серологического и молекулярного (ПЦР).

Суммируя вышеизложенное, необходимо отметить, что полученные результаты важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции. Для оценки эффективности существующих вакцин против менингококка серогруппы В в нашей работе исследованию методом полногеномного секвенирования подверглись 7 изолятов *N.*

*meningitidis* серогруппы В, выделенных от больных (0-17 л). При загрузке последовательностей соответствующих геномов на ресурс PubMLST *Neisseria* с целью изучения MenDeVAR Index были получены следующие результаты в соответствии с таблицей 1. Основываясь на полученных данных, иммуногенные компоненты вакцины 4CMenB (Bexsero), а именно, один из геномных белков (фактор H, связывающий белок, fHbp) имеет перекрестную реактивность с антигенами двух изолятов из семи: fHbp\_peptide:37.

Таблица 1 - Характеристика перекрестной реактивности антигенов изолятов *N. meningitidis* серогруппы В (НИИДИ-ДНКЦИБ) и компонентов вакцин

Изолят (n=7)	PubMLST Id	Вакцина	
		4CMenB (Bexsero)	rLP2086 (Trumenba)
70	118273	Недостаточно данных*	fHbp_peptide:25**
57	118276	Недостаточно данных	fHbp_peptide:25
344	118274	fHbp_peptide:37	Недостаточно данных
62	118277	fHbp_peptide:37	Недостаточно данных
171	118275	Недостаточно данных	Недостаточно данных
42	118272	Недостаточно данных	fHbp_peptide:25
60	118278	Недостаточно данных	Недостаточно данных

Примечание: \*Изолят содержит антигены, для которых недостаточно данных для сравнения; \*\*Изолят содержит  $\geq 1$  вариант антигена, который по результатам экспериментальных исследований считается перекрестно-реактивным к компонентам вакцины

В трех случаях из семи имеется перекрестная реактивность компонентов вакцины Trumenba с антигенами изолятов: fHbp\_peptide:25. Однако, следует отметить, что в изолятах не было обнаружено ни одно точное соответствие последовательностей аминокислот антигенам вакцин, только отдельные пептиды соответствуют вариантам вакцин против менингококков серогруппы В.

***N. meningitidis* у здоровых лиц.** Носоглоточные мазки у абитуриентов/курсантов ВМА были получены в следующие временные промежутки: в первый день - по прибытии в учебный лагерь перед экзаменами (n=671); на 30-й день - после сдачи экзаменов, зачисления в ВМА и формирования коллектива (n=261); на 60-й день (n=232); через 12 месяцев – перед отъездом на каникулы (n=214); через 13 месяцев – после возвращения с каникул (n=220). Частота выявления носительства *N. meningitidis* (суммарное выявление культуральным

методом и в ПЦР) в различные временные периоды варьировала от 7.7% до 17.8% (Таблица 2). Культуру *N. meningitidis* удавалось выделить с частотой от 2.7% до 10.3%. Все образцы, положительные по культуральному методу, были положительны и по ПЦР. Из образцов, отрицательных в ПЦР, не было выделено жизнеспособных изолятов. Из представленных в таблице данных следует, что в течение периода наблюдения изменялся серогрупповой состав менингококков, циркулирующих в коллективе. На момент прибытия в учебный лагерь серогрупповой состав отличался наибольшим разнообразием, были обнаружены все серогруппы, кроме А, преобладали изоляты серогрупп В и W, а также негруппируемые. С 30-го по 60-й день наблюдения в коллективе циркулировали менингококки серогруппы W и негруппируемые, а в более поздний период – только негруппируемые. Большинство негруппируемых менингококков было выявлено методом ПЦР, у всех у них была обнаружена вставка нулевого локуса (*capsule null locus – cnl*) длиной 113-114 п.н.

Таблица 2 - Результаты детекции и типирования *N. meningitidis* в носоглоточных мазках носителей

Серо- груп па	День 1 (N=671)			День 30 (N=261)			День 60 (N=232)			12 месяцев (N=214) *13 месяцев (N=220) **					
	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)	Культ ура +ДНК, n	ДНК, n	Всего n (%)
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	17	-	17 (16.1)	-	-	-	-	-	-	-	1	1(2.6)	-	-	-
C	1	-	1 (0.9)	-	-	-	1	-	1 (2.7)	-	-	-	-	-	-
W	4	7	11 (10.4)	1	5	6 (30.0)	14	11	25 (67.6)	-	-	-	-	-	-
X	2	1	3 (2.8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	2	4	6 (5.7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z	1	-	1 (0.9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NG	13	54	67 (63.2)	6	8	14 (70.0)	9	2	11 (29.7)	4	33	37 (97.4)	-	19	19 (100)
Всего	40	66	106 (100)	7	13	20 (100)	24	13	37 (100)	4	34	38 (100)	-	19	19 (100)
Носи тели, %	6.0	9.8	15.8	2.7	5.0	7.7	10.3	6.5	15.9	1.9	15.9	17.8	-	8.6	8.6

Примечание: \* через 12 месяцев – перед отъездом на каникулы;

\*\* через 13 месяцев – после возвращения с каникул



## **Сравнительная оценка методов определения антибиотикочувствительности изолятов *N. meningitidis***

В ходе проведения сравнительного анализа методов оценки антибиотикочувствительности менингококков (МПК, мг/л) установлена различная диагностическая эффективность исследуемых методов (Рисунок 3). Так, при оценке чувствительности менингококков к пенициллину (Рисунок 3а) следует, что из 98 исследованных штаммов для 75 (76.5%) значения МПК, полученные с помощью метода серийных разведений в агаре и с помощью Е-теста, полностью совпали. Для 21 штамма (21.4%) различия составили одно разведение. Различия более чем на одно разведение были выявлены только для двух штаммов (2.1%). При сравнении метода серийных разведений в агаре и бульоне (Рисунок 3б) различия более чем на одно разведение были выявлены для 74 штаммов (75.5%). При сравнении Е-теста и метода серийных разведений в бульоне (Рисунок 3в) различия больше чем на одно разведение также были выявлены для 69 штаммов (70.4%). При этом в большинстве случаев значения МПК, выявленные методом серийных разведений в бульоне, существенно превышали МПК, выявленные методом серийных разведений в агаре или Е-тестом. Для 12 изолятов (12.2%), охарактеризованных как чувствительные к пенициллину методами основанными на агаре, методом разведений в бульоне были получены значения МПК, соответствующие критерию устойчивости. Однако устойчивость к пенициллину у этих изолятов не была подтверждена молекулярными методами, нуклеотидные последовательности пенициллинсвязывающих белков соответствовали дикому типу.

Принципиально сходные результаты были получены и при сравнении трех методов при оценке чувствительности менингококков к другим антибиотикам (ампициллину, меропенему, хлорамфениколу, азитромицину, рифампицину, ципрофлоксацину, цефтриаксону). Очевидно, что метод разведений в агаре и метод Е-тест обеспечивают получение более достоверных результатов при тестировании *N. meningitidis*.

а)	Пенициллин											
	Агар, мг/л											
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5
0,002	35	9										1
0,004		1	1									
0,008				1								
0,016					1							
0,032					13							
0,064						19						
0,094								6				
0,125								5				
0,19									2			
0,25										2		
0,38						1					1	
0,5												

б)	Пенициллин											
	Агар, мг/л											
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5
0,002												
0,004												
0,008												
0,016	1				4	3						
0,032	15	2	1		5	3		2				
0,064	3	3			3	3		3		1		
0,094						1						
0,125	6	4		1		2		4		3		1
0,19												
0,25	4	1				4		2				
0,38												
0,5	1	2			1	2						
1	1				1							1
2	2					1						
4						1						

в)	Пенициллин										
	Е-тест, мг/л										
	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38
0,002											
0,004											
0,008											
0,016	1				4	3					
0,032	16	2		1	4	3	1	1			
0,064	6				3	3	3			1	
0,094											
0,125	10		1			3	1	3	2	1	1
0,19								1			
0,25	5					3	1				1
0,38											
0,5	3				1	2					
1	2				1						
2	2					1					
4						1					

Рисунок 3 – Результаты сравнения методов разведения в агаре и бульоне и Е-теста при оценке чувствительности к пенициллину

Примечание: Зеленым цветом выделены совпадающие значения МПК, желтым – различающиеся на одно разведение; а): МПК, определенная методами Е-тест-Агар; б) МПК, определенная методами Бульон-Агар; в) МПК, определенная методами Бульон-Е-тест

В результате определения чувствительности изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных и носителей к антибактериальным препаратам, используемых для лечения и профилактики, выяснилось, что количество изолятов со сниженной чувствительностью к маркерному антибиотику – бензилпенициллину больше в группе изолятов, выделенных от больных (38%). Результаты оценки определения чувствительности включенных в исследование изолятов *N. meningitidis* к актуальным для них антибиотикам приведены на рисунке 4.

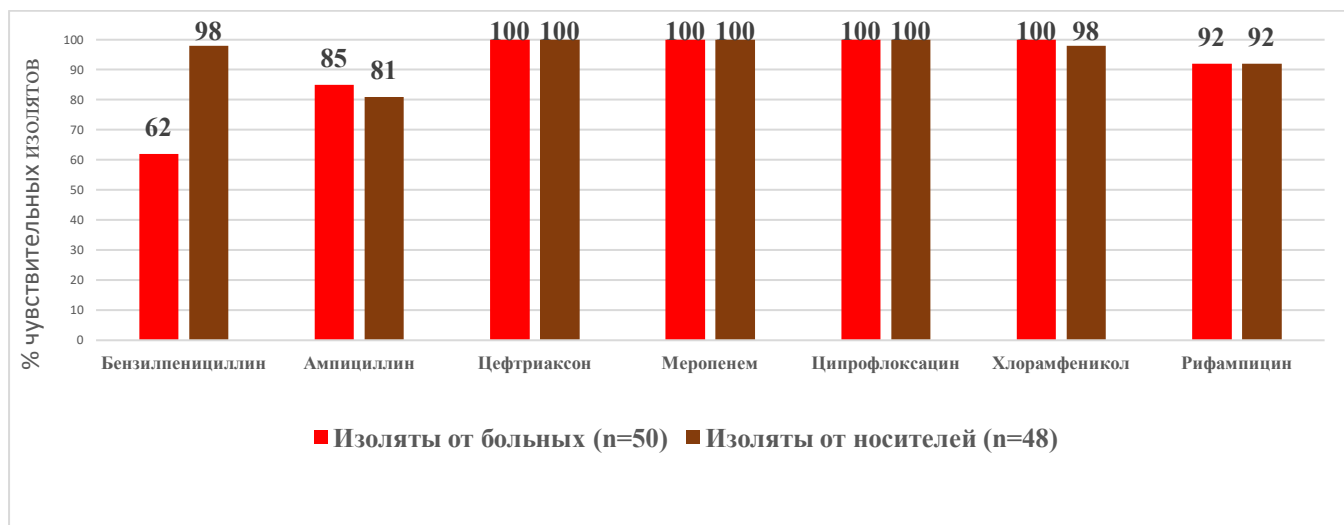


Рисунок 4 - Характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам *N. meningitidis* выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей

Обращает на себя внимание тот факт, что к цефтриаксону, меропенему, а также к ципрофлоксацину сохраняется чувствительность (100%) как в группе изолятов, выделенных от больных, так и в группе изолятов, выделенных от носителей. Следует отметить обнаружение единичных изолятов, устойчивых к рифампицину и хлорамфениколу как у носителей, так и у больных ГФМИ.

### Полногеномное секвенирование

На основании проведенного полногеномного секвенирования выявлено, что в Санкт-Петербурге изоляты *N. meningitidis*, выделенные от больных генерализованными формами инфекции и носителей, представлены различными серогруппами и сиквенс-типами (ST) (Рисунок 5).

Впервые в Санкт-Петербурге выявлена высокая гетерогенность среди изолятов *N. meningitidis*, относящихся к 12 сиквенс-типам, из которых 3 (ST-1136, ST-2146 и ST-9126)

ранее в России не встречались. Идентифицированные сиквенс-типы входили в состав 8 клональных комплексов. Кроме того, впервые в Российской Федерации были выделены штаммы *N. meningitidis*, входящие в клональные комплексы (clonal complex) CC-1136 и CC-198, CC-174.

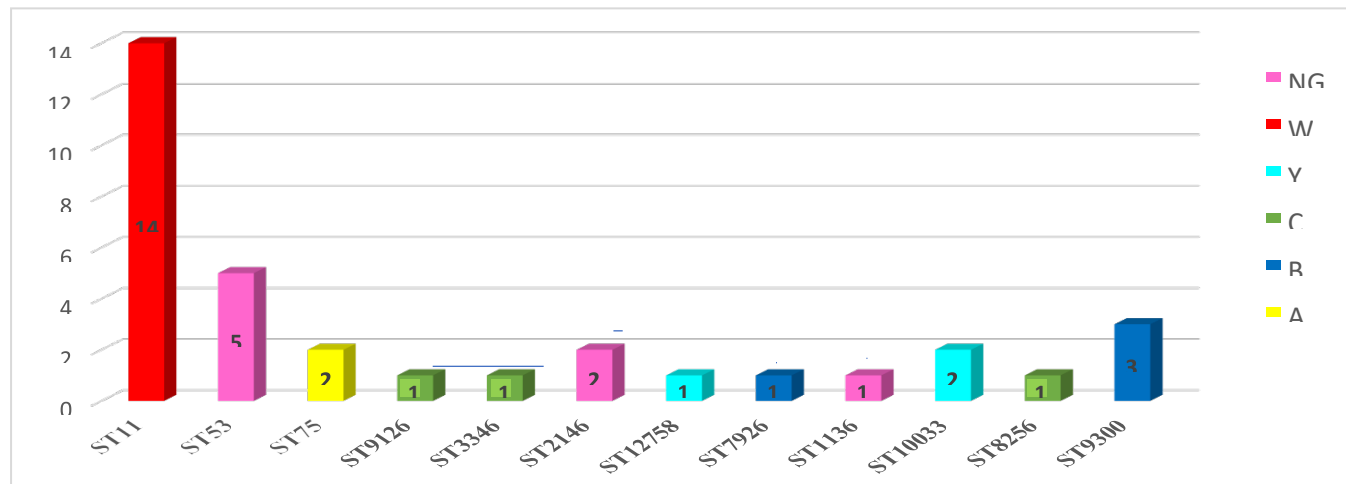


Рисунок 5 – Серогруппы и сиквенс-типы выделенных изолятов *N. meningitidis*, n=34

В ходе проведения анализа полногеномного секвенирования определены детерминанты резистентности и вирулентности изолятов *N. meningitidis*, изучены 23 пенициллинчувствительных и 14 нечувствительных к пенициллину изолятов *N. meningitidis*.

Филогенетический анализ показал, что российские изоляты W-ST11 образуют отдельную линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj.

Эта линия, в свою очередь, была разделена на три подлинии: одна – изоляты из Москвы и две – изоляты из Санкт-Петербурга (Рисунок 6).

Это означает, что при условии отсутствия введения вакцинации от W-серогруппы *N. meningitidis* существует опасность очередного подъема заболеваемости менингококковой инфекцией.

Четыре изолята в одной из подлиний продемонстрировали сниженную чувствительность к пенициллину. Клада А полностью состоит из инвазивных изолятов, в то время как в кладе В все, кроме одного - 90\_FG – были изолированы от носителей. Это может быть ассоциировано с вариантами NadA, одного из факторов вирулентности, ассоциированного с прикреплением к эпителию. Типирование изолятов NmW (n=14) по генам вирулентности и исследование их филогенетических отношений с Хадж-кластером определило их принадлежность к глобальной группе Хадж-кластера *N. meningitidis*.

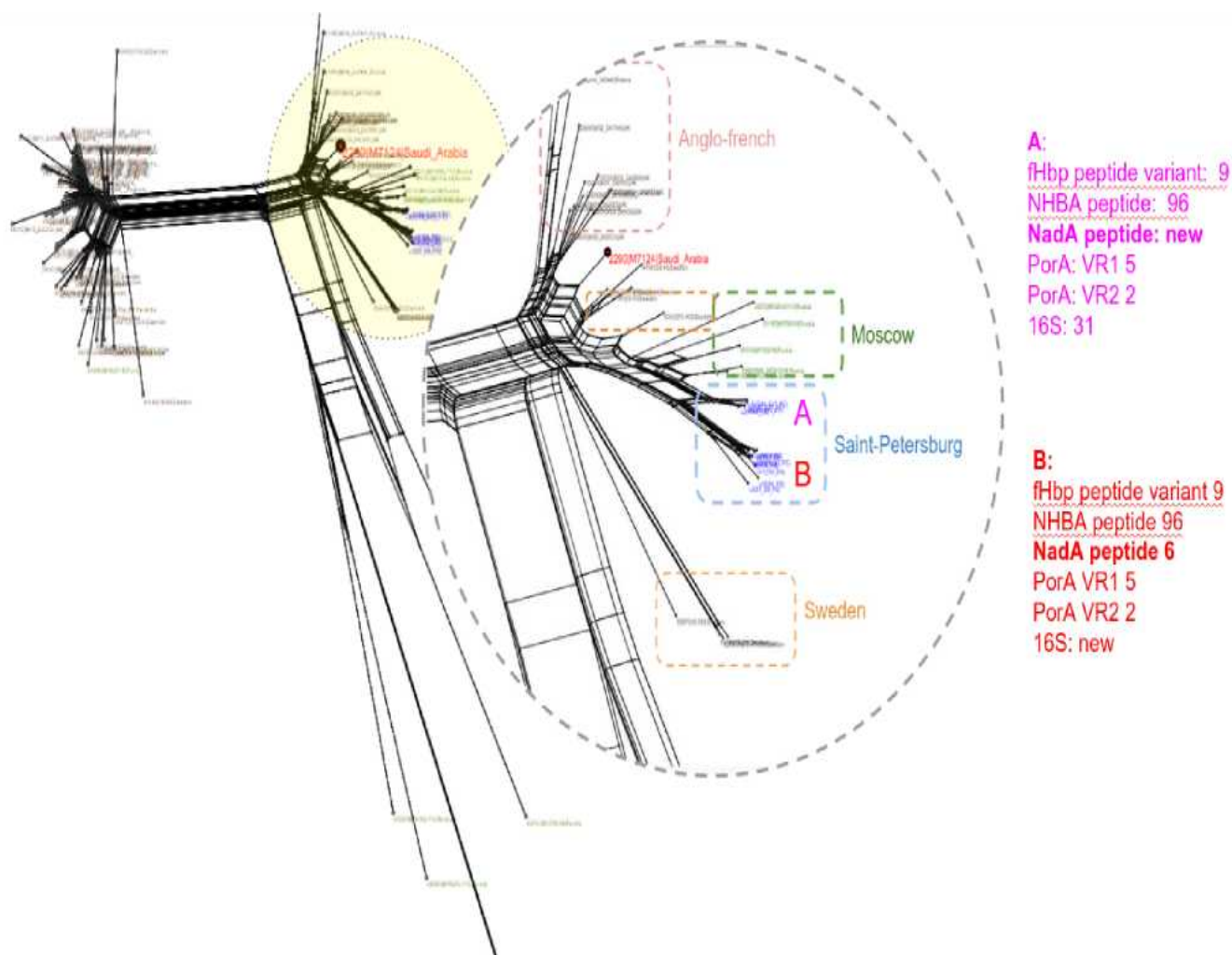


Рисунок 6 - Характеристика групп изолятов внутри Хадж-кластера

Примечание: изоляты из Санкт-Петербурга (n=14) представлены в двух кладах А и В. Всего штаммов n=6150 серогруппы W; изоляты из Москвы (n=11)

## ВЫВОДЫ

1. Применение ПЦР повышает эффективность диагностики менингококковой инфекции за счет сокращения сроков исследования и увеличения числа положительных результатов, а также позволяет определять серогрупповую принадлежность ДНК непосредственно из биологических образцов и верифицировать принадлежность жизнеспособных изолятов и ДНК к негруппируемой категории.

2. В популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге, доминируют изоляты серогруппы В (52%), на серогруппы С и W приходится по 15%, на каждую из серогрупп А, Х и Y приходится менее 10%. Популяция представлена 12-ю сиквенс-типами, три из которых (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) ранее в России не встречались. Для изолятов

линии W-ST11, выделенных в Санкт-Петербурге и в Москве, установлена филогенетическая связь с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj.

3. Оптимальными методами определения чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам являются эпсилотрихический (E-тест) и серийных разведений в агаре. Менингококки, циркулирующие в Санкт-Петербурге, характеризуются высоким уровнем чувствительности к большинству антибактериальных препаратов, за исключением пенициллинов, снижение чувствительности к которым связано с мутациями в генах пенициллинсвязывающих белков.

4. На основании оценки чувствительности к антибактериальным препаратам изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и от носителей, установлено, что для лечения генерализованных форм менингококковой инфекции в качестве препаратов выбора следует рекомендовать цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – цiproфлоксацин или цефтриаксон или рифампицин при учете возрастных ограничений.

5. Преобладание в Санкт-Петербурге *N. meningitidis*, серогруппы В необходимо учитывать при формировании стратегии вакцинации от менингококковой инфекции.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для определения антибиотикочувствительности изолятов *N. meningitidis* метод с использованием MIC-полосок (E-тест) и метод разведений в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения.

2. Для лечения генерализованных форм менингококковой инфекции в качестве препаратов выбора следует рекомендовать цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – цiproфлоксацин или цефтриаксон или рифампицин с учетом возрастных ограничений.

3. При микробиологической диагностике менингококковой инфекции целесообразно проводить углубленное изучение выделенных изолятов для выявления родственных связей с глобальными гипервирулентными генетическими линиями, а также для отслеживания динамики антибиотикорезистентности изолятов *N. meningitidis*.

4. Оптимизированный алгоритм исследования рекомендуется использовать для идентификации и типирования *N. meningitidis* как изолятов, так и для обнаружения

возбудителя в биологических образцах (кровь, цереброспинальная жидкость) больных генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей (назофарингеальные мазки) в практических лабораториях здравоохранения.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Пополнять имеющуюся коллекцию изолятов *N. meningitidis* для дальнейшего мониторинга за циркуляцией менингококков как среди больных, так и среди носителей с выявлением механизмов резистентности к антибактериальным препаратам.

2. Дальнейшее изучение серогрупповой принадлежности изолятов, выделенных от носителей, для прогнозирования серогруппового пейзажа при возможном очередном подъеме заболеваемости.

3. Необходимо исследовать респираторные образцы детей от 0 до 17 лет в различных организованных коллективах с целью изучения частоты и спектра носительства *N. meningitidis*.

4. Дальнейшее проведение мониторинга нуклеотидных последовательностей изолятов *N. meningitidis* серогруппы В, выделенных в Санкт-Петербурге от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей, с определением индекса MenDeVAR для определения полноты охвата покрытия вакцинами против менингококков серогруппы В.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мартенс, Э.А.** Использование метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления и идентификации патогенов в гемокультурах у педиатрических пациентов / **Э.А. Мартенс, Е.Е. Киселева, В.Н. Чеботкевич, С.С. Бессемельцев** // Вестник гематологии. – 2018. - Т. 14, №4. - С. 36.

2. **Martens, E.A.** Comparison of phenotypic and molecular-genetic properties of the strains *Neisseria meningitidis* isolated from patients with generalized forms of meningococcal infection and carriers / **E.A. Martens, S.V. Sidorenko, L.I. Zhelezova** // Мат. международной конф. «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г. – Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, №4. – С. 515.

3. **Martens, E. Observational study of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in entrants and first-year military students in the Russian Federation / E. Martens, S. Sidorenko, Y. Lobzin // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. - Т. 81. - P. 12-16.**
4. **Мартенс, Э.А.** Менингококковая инфекция в современных условиях: клинические, микробиологические и профилактические аспекты / **Э.А. Мартенс**, К.В. Маркова, Н.В. Скрипченко, Ю.В. Лобзин, В.Е. Карев, А.А. Вильниц, Е.Ю. Горелик, С.В. Сидоренко // Педиатр. – 2020. - Т.11, №3. - С. 81-92.
5. **Мартенс, Э.А.** Последствия перенесенной менингококковой инфекции тяжелого течения/ **Э.А. Мартенс**, В.В. Шарабханов, К.В. Жданов, С.М. Захаренко, С.В. Сидоренко, К.С. Иванов, М.В. Яременко // Лечение и Профилактика. – 2020. – Т. 10, №2. - С. 71-76.
6. **Мартенс, Э.А.** Проблемы вакцинопрофилактики менингококковой инфекции в Вооруженных Силах / **Э.А. Мартенс**, К.В. Жданов, С.М. Захаренко, К.С. Иванов, К.В. Козлов, Ю.И. Ляшенко, С.В. Сидоренко // Военно-медицинский журнал. - 2021. - Т. 342, №6. - С. 36-42.
7. **Мартенс, Э.А.** Клинико-микробиологические особенности менингококковой инфекции у детей / **Э.А. Мартенс**, К.В. Маркова, Е.Ю. Скрипченко, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Л.Н. Мазанкова, С.В. Сидоренко, Е.Ю. Горелик // Практическая медицина. – 2021.- Т. 19, №2. - С. 61-69.
8. **Martens, E.** Genomic characterization of *Neisseria meningitidis* from the Russian Federation / **E. Martens**, L. Zhelezova, D. Likholetova, V. Gostev, S. Sidorenko// Materials of the 31th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Viena, Austria, 9-11 July 2021 г. – 04542. – ePoster Presentation.
9. **Мартенс, Э.А.** Молекулярная характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W в Санкт-Петербурге / **Э.А. Мартенс**, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, С.М. Захаренко // Антибиотики и химиотерапия – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 14-18.
10. **Мартенс, Э.А.** Антибиотикочувствительность *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и от здоровых носителей / **Э.А. Мартенс**, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, Д.П. Гладин // Антибиотики и химиотерапия – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 19-24.



## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

МПК – минимально подавляющая концентрация

ST – sequence type (сиквенс-тип)

Nm – *N. meningitidis*

П.н. – пар нуклеотидов